

Nicotiana tabacum 과 *Petunia inflata*의 電氣的 原形質體融合에 의한 屬間 體細胞 雜種의 生成

金 濬 喆¹ · 李 錫 求^{*} · 李 光 雄^{**}

(慶尙大學校 生物學科 · *林木育種研究所 · **서울大學校 植物學科)

Intergeneric Somatic Hybrids by Electrofusion of Protoplasts Between *Nicotiana tabacum* and *Petunia inflata*

Kim, Joon Chul, Suk Koo Lee* and Kwang-Woong Lee**

(Department of Biology, Gyeongsang National University, Jinju, *Institute of Forest Genetics, Suwcon,

**Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

ABSTRACT

Leaf mesophyll protoplasts of *Nicotiana tabacum* (nitrate reductase deficient mutant) were fused with cell suspension protoplasts of albino *Petunia inflata* in an electric field. Hybrid cell colonies were selected for nitrate reductase proficiency and chlorophyll synthesis. Five hybrid plant lines, regenerated from the selected calli lines, were analysed by electrophoresis, number of chromosomes and morphological characters. Somatic hybrid plants showed both parent patterns in the isozymes of isoleucine aminopeptidase and esterase. The hybrids had the expected chromosome number of 62 and exhibited an intermediate floral morphology when compared with the parents, but plant height and leaf arrangement were similar to *N. tabacum*.

緒 論

電氣的 衝擊에 의하여 식물 原形質體의 세포막에 가역적인 파괴가 일어나고 이로 인하여 서로 인접한 원형질체의 융합현상이 보고된 이래 (Senda *et al.*, 1979, 1982; Zimmermann, 1982), 식물 원형질체의 전기적 융합에 관하여 많은 관심이 집중되고 있는 바, 보다 효율적인 융합체의 형성을 위하여 융합기기가 개선되고 (Bates *et al.*, 1983; Watts and King, 1984), 전기적 충격이 세포에 미치는 영향들, 즉 세포의 생존력, 세포벽 생성 및 세포의 분열능력 등이 밝혀짐으로써 원형질체의 전기적 융합에 의한 체세포 잡종 생성의 가능성이 대두되게 되었다 (Zachrisson and Bornman, 1984; Suh and Lee, 1986).

최근 異型細胞사이에서 보다 많은 융합체를 획득하기 위하여 다량의 원형질체에 전기적 충격을 가할 수 있는 multielectrode를 사용하는 방법이 보고되었는 바 (Puite *et al.*, 1985), 이것은 소량의 원형질체에 전기충격을 가할 때보다 높은 융합체 형성률을 얻을 수

1. 文敎部支援 海外派遣教授(英國 Nottingham大學校, 1985. 9-1987. 9)

있어, 원형질체간의 체세포 잡종 획득을 위한 전기적 융합방법의 이용을 한층 더 용이하게 해주고 있다.

Nicotiana 와 *Petunia*는 서로 강력한 不和合性(incompatibility)을 보이는 屬인 바, 본 연구에서는 이들의 원형질체를 사용하여 전기적 융합방법에 의하여 屬間雜種을 생성시키고자 시도하였다. 융합세포의 선발지표로서 nitrate reductase가 결여된 돌연변이체 담배 *Nicotiana tabacum* NR⁻ (Hamill *et al.*, 1983; Pental *et al.*, 1984)의 엽육세포와 엽록소가 결핍된 *Petunia* (albino *Petunia inflata*)의 액체 배양세포(Power *et al.*, 1979)에서 분리된 원형질체를 사용하여 電氣場 下에서 융합한 후 이 융합체를 선발배지에서 배양하여 체세포 잡종을 얻을 수 있었으며, 이 체세포 잡종 식물에 대한 형태학적 및 생화학적 특성을 조사하여 잡종을 확인할 수 있었기에 그 결과를 보고하고자 한다.

본 연구를 수행토록 도와주신 영국 노팅햄대학교 식물학과의 E. C. Cocking 교수와 J. B. Power 박사에게 감사드립니다.

材料 및 方法

原形質體 分離. 수경재배된 *Nicotiana tabacum* L.의 nitrate reductase결핍 돌연변이체 담배인 *Nicotiana* NR⁻(Hamill *et al.*, 1983)의 완전 전개된 잎을 7.5%(v/v) domesto용액(Lever Bros Kingston Upon Thames Surry, U. K.)에 30분간 소독하고 멸균 증류수로 3회 세척한 후 뒷면 표피를 제거하고 효소액(1.5% meicelase, 0.05% macerozyme R-10, 13% mannitol이 포함된 CPW용액(CPW 13 M), pH 5.8)에서 15시간동안 처리하였다. Albino *Petunia inflata*에서 유래한 엽록소가 결여된 액체배양 세포(Power *et al.*, 1979)는 UM배지(Uchimiyama and Murashige, 1974)에서 1주일 간격으로 계대배양하였으며 계대배양 4일후 세포를 수확하여 효소액(2% rhyzyme HP 150, 2% meicelase, 0.03% macrozyme R-10, CPW 13 M, pH 5.8)에 15시간동안 처리하였다. 각각의 효소액 처리 시료는 64 μ m filter로 걸러 원형질체가 포함된 효소액을 80 \times g에서 5분간 원심분리하여 효소액을 제거한 후 설탕이 21% 포함된 CPW용액(CPW 21S)(Frearson *et al.*, 1973)을 넣고 100 \times g에서 10분간 원심 분리하여 이 설탕액 표면에 층을 이루는 건전한 원형질체를 수확하였다. 이 수확된 원형질체는 융합용액(2 mM CaCl₂, 11% mannitol, pH 5.8)으로 80 \times g에서 5분간 원심분리방법에 의하여 2회 세척한 후 각각의 원형질체 농도를 10⁵/ml 되게 조절하였다.

原形質體의 電氣場 下 融合. 융합용액에 10⁵/ml의 농도로 조절된 각각의 원형질체를 1:1 비율로 혼합하여 2 ml의 원형질체 혼합액을 electrofusion system(Fig. 1)의 fusion chamber로 사용된 25개-분획 페트리디쉬(Fig. 1D)의 각각 (20 \times 20 mm)에 넣고 multi-parallel plate전극(전극 간격 3 mm)을 사용하여 15분동안 0.5 MHz의 교류를 통과시켜 원형질체 사슬(pearl chain)을 형성시켰으며 직류 1 kV/cm에서 2 ms동안 전기 pulse를 주어 융합시켰다.

융합후 AAP1 9M 배지[MS배지에서 무기질소대신 6 mM L-glutamine, 2 mM L-aspartic acid, 1 mM L-arginine 및 0.1 mM glycine을 첨가하고, 2 mg/l α -naphthaleneacetic acid (NAA), 0.5 mg/l benzylaminopurine (BAP) 및 9% mannitol을 첨가함]로 80 \times g에서 5분간 세척한 후 원형질체 농도를 5 \times 10⁴/ml 되게 조절하였다.

融合細胞塊 選拔 및 植物體 分化. 전기장 하에서 융합된 원형질체는 25 $^{\circ}$ C, 600 lux의 연속 형광 조명하에서 배양되었으며 2주 간격으로 AAP1 9M배지의 9% mannitol 농도를 3.0% point씩

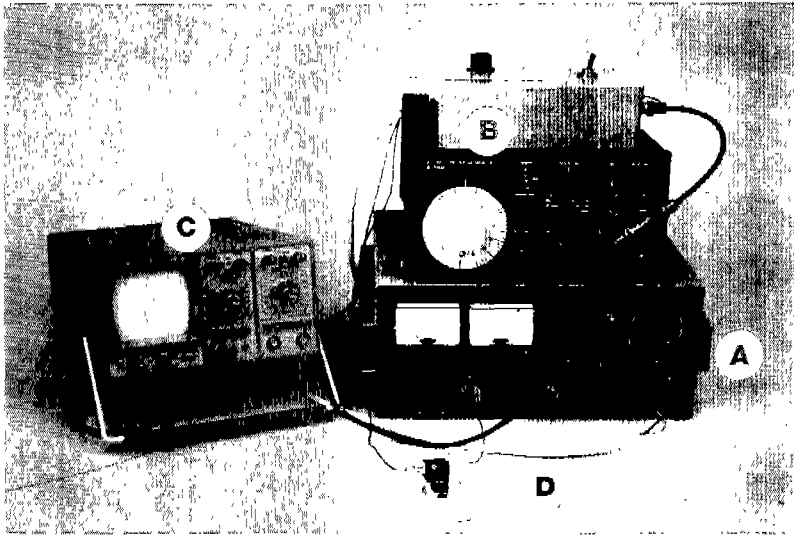


Fig. 1. Electrofusion system used in the present studies. A, function generator; B, pulse generator; C, oscilloscope; D, multiparallel electrodes and fusion chamber of 25-compartment-petridish (100×100 mm).

감소시켰다. 6주후 암록색의 세포괴는 MSNO₃배지(MS배지에서 NH₄NO₃ 대신 20.6 mM KNO₃가 첨가되고, 0.1 mg/l NAA, 5 mg/l BAP 및 0.6% agar를 첨가함)에 옮겨 3개월 동안 배양한 후 계속 증식하는 녹색 칼루스를 선발하였다. 이 칼루스는 기관형성배지인 MSZ배지(MS배지에 1 mg/l zeatin 및 0.6% agar 첨가됨)에 다시 옮겨 shoot를 형성시킨 후 20~30 mm 크기의 shoot를 절단하여 MSO배지(MS배지+0.6% agar)에서 발근시켰으며 분화된 식물체는 온실에 옮겼다. 본 실험에 사용된 배지 중 AAPI과 MSNO₃는 membrane filter(0.45 μm)에 의하여 멸균하였다.

染色體 및 Isozyme Pattern 調査. 염색체는 근단을 잘라 β-bromonaphthalene의 포화된 용액에 담가 4°C에서 2시간 전처리한 후 acetic acid : alcohol(1 : 3)용액에 옮겨 15시간동안 고정하였으며 Schiff's reagent(BDH)로 2시간 동안 상온 암조건하에서 염색하여 smear방법에 의하여 검경하였다. 전기영동은 9% (w/v) polyacrylamide slab gel과 vertical gel 전기영동기기(LKB)를 사용하였고, 전기영동을 위한 시료는 완전 전개된 염조직을 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 μm leucopetin, 10 mM MgCl₂가 포함된 용액에 4°C에서 갈아 10,000×g에서 15분간 원심 분리하여 추출하였다. Isoleucine aminopeptidase는 Scandalios(1969)의 방법, esterase는 Smith 등(1970)의 방법에 준하여 염색하였다.

結果 및 考察

N. tabacum NR⁻의 엽육세포에서 분리한 원형질체와 albino *P. inflata*에서 유래한 액체배양 세포의 원형질체(Fig. 2A)를 전기장 하에서 융합시켰다. 전기적 융합과정에서 처음 15분간 0.5 MHz교류의 통과는 2 전극사이에 있는 원형질체 막에 생긴 극성에 의하여 서로 이끌려서 pearl

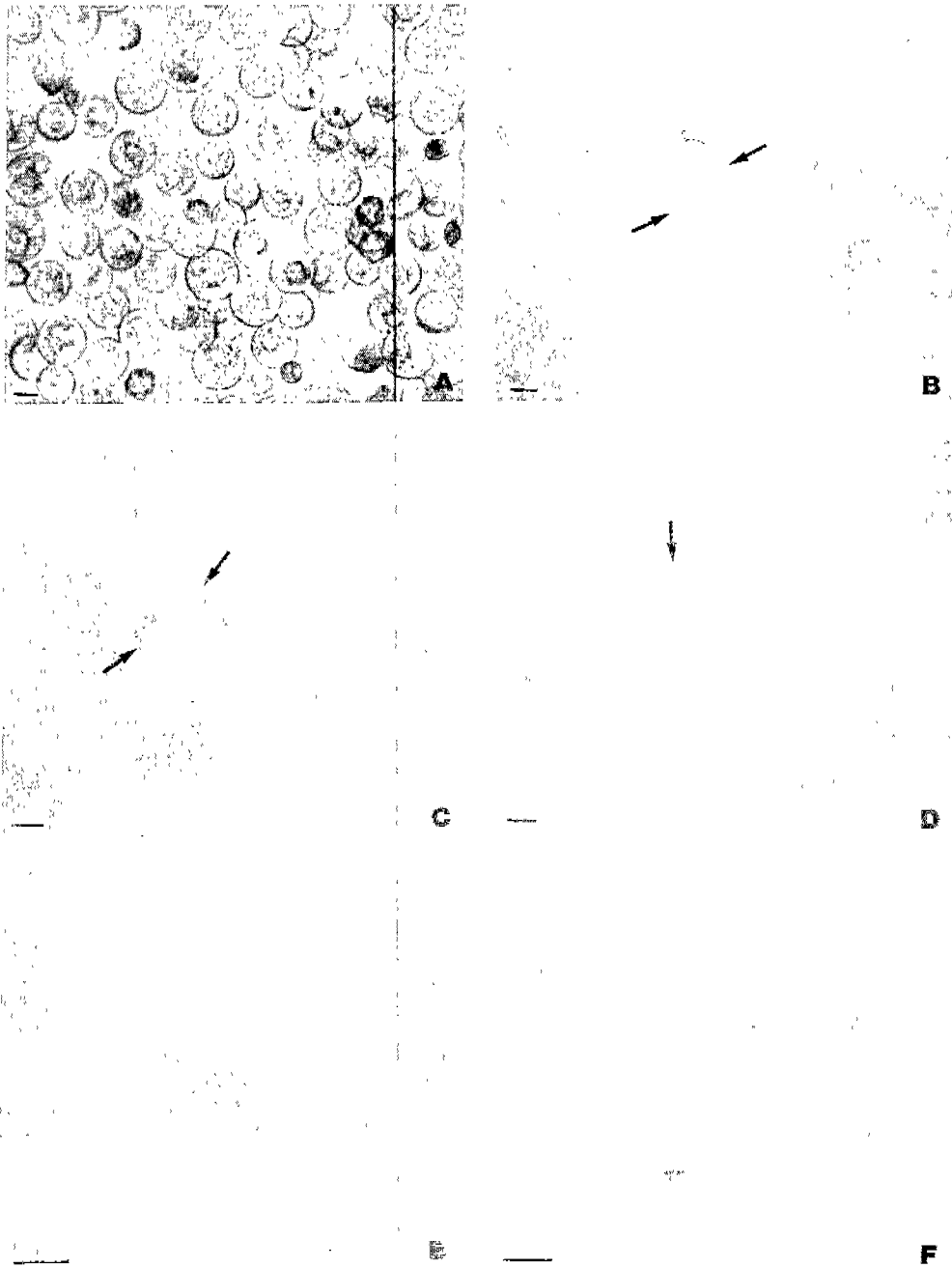


Fig. 2. Homo- or hetero-plasmically fused protoplasts and colony formation between *N. tabacum* and *P. inflata*. A, protoplasts isolated from the suspension cultured cells of albino *P. inflata*; B, C and D, homo- or hetero-plasmically (arrows) fused protoplasts at 10 and 15 mins after electrofusion; E, first dividing cells after 3 days of culture; F, colony formation after 10 days of culture. Bars=20 μ m.

chain을 만들게 하였고, 다음에 이어 2 ms 동안 직류로 전환된 1 kV/cm의 전기 pulse는 원형질 막에 틈을 만들어 인접한 원형질체를 융합토록 하였으며, 수 분후 타원형의 융합체가 관찰되었다(Fig. 2B, C, D).

전기적 융합에 의한 체세포 잡종의 생성은 *Nicotiana*(Watts and King, 1984; Bates and Hasenkampf, 1985; Kohn *et al.*, 1985), *Brassica*(Zachrisson and Bornman, 1984), *Avena*(Verhoek-Köhler *et al.*, 1983) 등에서 보고된 바 있으나 융합배지, pearl chain 형성 및 직류전압의 세기에 관한 최적 조건은 각각 상이하하였다. 본 실험에서 사용한 fusion chamber는 Watt와 King(1984)의 경우와 동일한 원리로 고안되었으나 전극 수를 5개에서 7개로 늘림으로써 1회에 융합할 수 있는 양을 1 ml에서 2 ml로 확대하였던 바, 다량의 원형질체에서 일시에 전기적 융합체를 획득할 수 있게 되었다. 융합조건은 Watt와 King(1984)의 조건에 비하여 원형질체 밀도, 직류전압의 세기 및 처리 시간에서 차이가 있으나, 밀도에 대한 <전압의 세기 × 처리 시간>은 일치하는 것으로 나타났다.

*N. tabacum*의 엽육세포와 *P. inflata*의 액체배양 세포에서 분리된 원형질체의 전기장하에서의 異型核 융합률은 평균 1.8%였으며, 이 융합률은 *N. tabacum*과 *P. inflata*간의 polyethylene glycol(PEG)-high pH처리방법에 의하여 보고된 (Pental *et al.*, 1986) 1.0%보다 2배 가까이 높은 것이다.

융합후 배양된 원형질체는 5×10^4 /ml의 밀도로 배양한 3日 후부터 세포분열을 시작하였으며(Fig. 2E) 10일 후에는 작은 세포괴를 형성하였다(Fig. F). 배양 6주후 MSNO₃ 0.6% agar 선택배지에서 3개월간 계대배양하였으며 최종적으로 칼루스생장이 우수한 12계통만을 선발하였다(Fig. 3A). 이 계통들은 MSZ배지에서 shoot가 분화된 후 5계통에서 완전한 식물체로 자랐다(Fig. 3B, C, D). 이 융합체 선발과정에서 albino *P. inflata*에서 유래한 원형질체는 녹색 세포군을 만들 수 없고 (Power *et al.*, 1979), *N. tabacum* NR⁻ 플러변이체에서 유래한 원형질체는 AAP1 배지에서는 녹색 세포군을 형성하나 선발배지인 MSNO₃배지에서는 NO₃⁻를 이용하지 못하므로 세포분열이 중지되어 갈색으로 변한다는 사실(Hamill *et al.*, 1983)과 일치된 현상을 본 실험에서도 관찰할 수 있었으며, 결과적으로 *N. tabacum* NR⁻과 albino *P. inflata*의 원형질체를 전기장 하에서 융합시킨 후 MSNO₃ 배지를 이용하여 이형핵융합체(heterokaryon)의 선발을 할 수 있었다.

母植物體와 체세포 잡종 식물의 상호 비교를 위하여 isoleucine aminopeptidase와 esterase를 분석한 결과(Fig. 4), isoleucine aminopeptidase 동위효소에서 체세포 잡종 식물은 양쪽 모식물체의 특성을 가지고 있음을 확인할 수 있었으며, SH₁, SH₃ 및 SH₅계통에서는 SH₂ 및 SH₄계통에 비하여 1개의 band(Rf 0.52)를 더 갖고 있었다(Fig. 4A). Esterase동위효소에서 체세포 잡종 식물은 양쪽 모식물체의 특성을 부분적으로 나타냈으며 모식물체에 없던 새로운 band(Rf 0.30)도 가지고 있었다(Fig. 4B).

또한 isoleucine aminopeptidase 동위효소에 의하여 SH₁, SH₃, SH₅와 SH₂, SH₄의 그룹으로 나뉘어졌던 특성이 esterase에서도 동일하게 2 그룹으로 구분되었다(Fig. 4B). 엽색체의 수에 있어서 체세포 잡종 식물은 양쪽 모식물체의 엽색체 수(*N. tabacum*, 48 및 *P. inflata*, 14)를 합한 수인 62개임이 확인되었다(Fig. 5A). 또한 체세포 잡종의 형태적 특성에서도 SH₂, SH₄계통의 체세포 잡종 식물은 자가수정이 되었으나, SH₁, SH₃, SH₅계통은 자가수정이 되지 않음으로써 역시 2 그룹으로 구분되었으며, 이것은 이들 잎과 꽃의 특징에 의하여서도 뒷받침 되었다. 즉, 체세포 잡종 식물 SH₁, SH₃, SH₅계통은 잎에 있어서 *P. inflata*가 보이는 세맥의 불규칙성과 잎



Fig. 3. Selected calluses and a somatic hybrid between *N. tabacum* and *P. inflata*. A, selected green calluses (arrows) in $MSNO_3$ medium after 1 month of culture; B, shoot formation; C, root formation of the transplanting shoot after 6 months; D, flowering of the regenerated hybrid plant. Bars = 20 mm in A and D, and 5 mm in B and C.

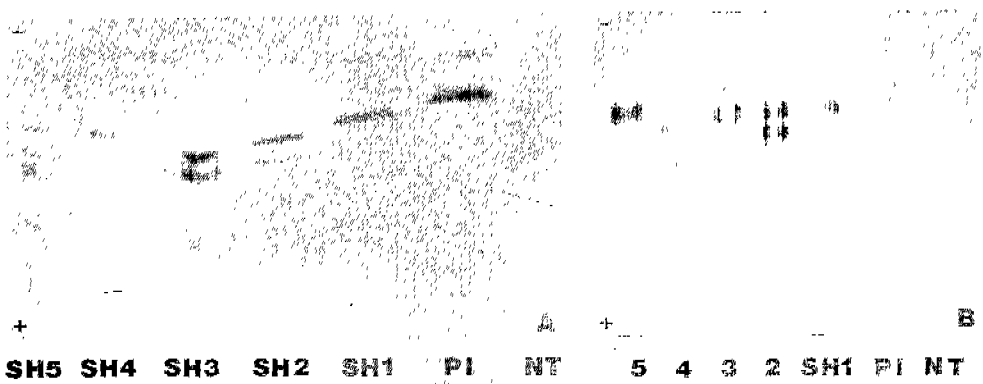


Fig. 4. Electrophoretic patterns of isoleucine aminopeptidase (A) and esterase (B) in the leaf of *N. tabacum* (NT), *P. inflata* (PI) and somatic hybrids (SH1, SH2, SH3, SH4 and SH5).

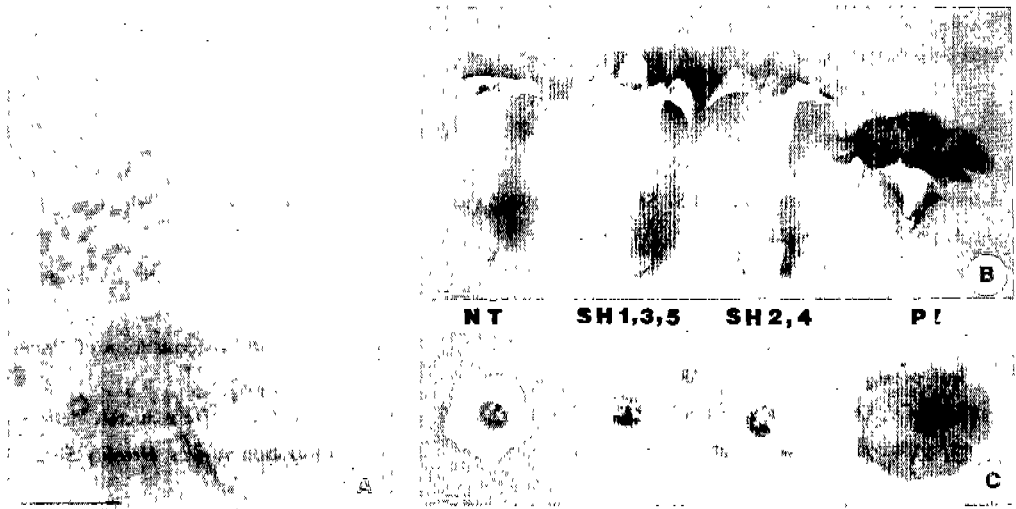


Fig. 5. Chromosomes in root tip (A) of a somatic hybrid, and floral morphology (B and C) in *N. tabacum* (NT) and *P. inflata* (PI), and somatic hybrids (SH1, SH2, SH3, SH4 and SH5) Bars=10 μm in A and 10 mm in B and C.

주변부의 주물주물한 (undulate) 특성을 보였으며, SH₂, SH₄ 계통은 *N. tabacum* 잎의 특성과 유사하여, 역시 2 그룹은 상이한 특성을 나타내었다. 꽃의 특성에 있어서도 꽃색깔은 체세포 잡종 식물에서는 짙은 분홍색을 띠어 옅은 분홍색인 *N. tabacum*보다는 짙고, 붉은 색인 *P. inflata*보다는 옅었으며, 꽃잎의 크기도 2 모식물체의 중간적 특성을 보였다 (Fig. 5B, C).

강력한 불화합성을 보이는 *Nicotiana*와 *Petunia*간(Sink and Power, 1978)의 체세포융합을 지금까지 식물체 수준에서 분석한 보고는 없었으며 다만 칼루스 단계에서 *Nicotiana*의 형질을 쉽게 잃어 버리고 *Petunia*의 형질만 남게 되어 *Petunia*를 낳은 식물로 분화된다는 보고가 있었다 (Li et al., 1982; Pental et al., 1986). 그러나 본 연구의 식물체 수준에서 분석된 체세포 잡종 식

물의 5계통은 isoleucine aminopeptidase와 esterase의 동위효소에서 양쪽 모식물체의 특성을 가지고 있고 꽃의 형태에서 중간적 특성을 보였으며, 잎모양 및 자가수정 여부에 의하여 붙염성 계통(SH₁, SH₂ 및 SH₃)과 자가수정하는 계통(SH₄ 및 SH₅)으로 구분되었고, 草長 및 잎의 배열 상태에서는 *N. tabacum*에 가까운 것으로 나타났다.

따라서 SH₁, SH₂, SH₃계통과 SH₄, SH₅계통은 *N. tabacum*과 *P. inflata*의 屬間體細胞雜種植物體임을 확인할 수 있었다.

摘 要

Nitrate reductase가 결핍된 突然變異體 담배(*Nicotiana tabacum* NR⁻)의 葉肉細胞와 albino *Petunia inflata*의 液體培養細胞에서 분리한 原形質體를 電氣場下에서 融合하고 이들 融合體를 nitrate reductase와 葉綠素合成을 이용한 選擇培地에서 培養, 細胞塊를 選抜하여 屬間體細胞雜種을 生成하였다. 選拔된 綠色 칼루스로부터 再分化된 體細胞雜種의 植物體 5系統을 電氣泳動, 染色體數와 形態의 特性에 따라 분석한 결과, 이 系統들은 isoleucine aminopeptidase 및 esterase 同位酵素에서 양면 母植物體의 band pattern 特性을 部分的으로 함께 나타냈고, 染色體數는 2母植物體數의 合인 62개를 가지고 있었다. 꽃의 형태에서는 中間型을 보였으며 草長 및 잎의 배열상태는 담배에 가까운 특성을 나타내었다.

參 考 文 獻

- Bates, G.W., I.I. Gaynor and N.S. Shekhawat. 1983. Fusion of plant protoplasts by electric fields. *Plant Physiol.* **72**: 1110-1113.
- Bates, G.W. and C. Hasenkampf. 1985. Culture of plant somatic hybrids following electrical fusion. *Theor. Appl. Genet.* **70**: 227-233.
- Frearson, E.M., J.B. Power and E.C. Cocking. 1973. The isolation, culture and regemeration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev. Biol.* **33**: 130-137.
- Hamill, J.D., D. Pental, E.C. Cocking and A.J. Müller. 1983. Production of a nitrate reductase deficient streptomycin resistant mutant of *Nicotiana tabacum* for somatic hybridization studies. *Heredity* **50**: 197-200.
- Kohn, H., R. Schieder and O. Schieder. 1985. Somatic hybrids in tobacco mediated by electrofusion. *Plant Sci.* **38**: 121-128.
- Li, X., W. Li and M. Huang. 1982. Somatic hybrid plants from intergeneric fusion between tobacco tumor B653 and *Petunia hybrida* W43 and expression of LpDH. *Sci. Sin.* **25**: 611-619.
- Melchers, G., M.D. Sacristan and A.A. Molder. 1978. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res. Commun.* **43**: 203-218.
- Pental, D., J.D. Hamill and E.C. Cocking. 1984. Somatic hybridization using a double mutant of *Nicotiana tabacum*. *Heredity* **53**: 79-83.
- Pental, D., J.D. Hamill, A. Pirrie and E.C. Cocking. 1986. Somatic hybridization of *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrida*. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 342-347.
- Power, J.B., S.F. Berry, J.V. Chapman and E.C. Cocking. 1979. Somatic hybrids between unilateral cross-incompatible *Petunia* species. *Theor. Appl. Genet.* **55**: 97-99.
- Puite, K.J., P.V. Wilselaar and H. Verhoevon. 1985. Electrofusion, a simple and reproducible technique in

- somatic hybridization of *Nicotiana plumbaginifolia* mutants. *Plant Cell Reports* **4**: 274-276.
- Scandalios, J.G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. *Biochem. Genet.* **3**: 37-79.
- Senda, M., H. Morikawa and J. Takeda. 1982. Electrical induction of cell fusion of plant protoplasts. In *Plant Tissue Culture* (E. Fujiwara ed.), pp. 615-616. Maruzen, Tokyo.
- Senda, M., J. Takeda, S. Abe and T. Nakamura. 1979. Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation. *Plant & Cell Physiol.* **20**: 1441-1443.
- Sink, K.C. and J.B. Power. 1978. Incongruity of interspecific and intergeneric crosses involving *Nicotiana* and *Petunia* species that exhibit potential for somatic hybridization. *Euphytica* **27**: 725-730.
- Smith, H.H., D.E. Hamill, E.A. Weaver and K.H. Thompson. 1970. Multiple molecular forms of peroxidases and esterases among *Nicotiana* species and amphiploids. *J. Hered.* **61**: 203-212.
- Suh, J.-W. and K.-W. Lee. 1986. Electrofusion of tobacco and pea protoplasts. *Korean J. Bot.* **29**: 1-10.
- Uchimiyu, H. and T. Murashige. 1974. Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* **54**: 936-944.
- Verhoek-Köhler, B., R. Hampp, H. Ziegler and U. Zimmermann. 1983. Electrofusion of mesophyll protoplasts of *Avena sativa*. Determination of the cellular adenylate-levels of hybrids and its influence on the fusion process. *Planta* **158**: 199-204.
- Watts, J.W. and J.M. King. 1984. A simple method for large scale electrofusion and culture of plant protoplasts. *Bioscience Reports* **4**: 335-342.
- Zachrisson, Z. and C.H. Bornman. 1984. Application of electric field fusion in plant tissue culture. *Physiol. Plant.* **61**: 314-320.
- Zimmermann, U. 1982. Electrical field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochim. Biophys. Acta* **694**: 227-277.
- Zimmermann, U. and P. Scheurich. 1981. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta* **151**: 26-32.
- Zimmermann, U. and J. Vienken. 1982. Electric field-induced cell-to-cell fusion. *J. Membrane Biol.* **67**: 165-182.

(1987. 2. 10. 接受)